

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平7-501140

第6部門第1区分

(43) 公表日 平成7年(1995)2月2日

(51) Int. Cl. ⁴	識別記号	庁内整理番号	F I
G 0 1 N 30/48		G 8310-2 J	
B 0 1 D 15/08		8014-4 D	
G 0 1 N 30/48		M 8310-2 J	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願平5-507935	(71) 出願人	コーネル・リサーチ・フアウンデーション・インコーポレーテッド
(86) (22) 出願日	平成4年(1992)10月21日		アメリカ合衆国ニューヨーク州14850イサ
(85) 翻訳文提出日	平成6年(1994)4月15日		カ・ソーンウッドドライブ20・スイート
(86) 国際出願番号	PCT/US92/09100		105
(87) 国際公開番号	WO93/07945	(72) 発明者	フレチエツト, ジーン・エム・ジエイ
(87) 国際公開日	平成5年(1993)4月29日		アメリカ合衆国ニューヨーク州14850イサ
(31) 優先権主張番号	779, 929		カ・フエアウエイドライブ25
(32) 優先日	1991年10月21日	(72) 発明者	スベク, フランティセク
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国ニューヨーク州14853イサ
(81) 指定国	EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, SE), JP	(74) 代理人	弁理士 小田島 晋吉

(54) 【発明の名称】 マクロ細孔ポリマー媒体が備わっているカラム

(57) 【要約】

マクロ細孔ポリマープラグの形態で分離用媒体を含んでいる連続液体クロマトグラフィーカラムを開示する。このカラムは、ビードまたは粒子が充填されている通常のカラムに比べて数多くの利点を有している。このプラグは、直径が200nm未満の小さい孔と、直径が600nm以上の大きい孔の両方を含んでいる。

請求の範囲

1. 硬質骨と、カラム内に配置されておりそしてこのカラムの断面領域を横切って伸びているマクロ細孔有線ポリマーの少なくとも1種の連続プラグを含んでいる連続液体クロマトグラフィーカラムにおいて、このプラグが、約200nm未満の直径を有する小さい孔と、約600nm以上の直径を有する大きな孔を含んでおり、そしてこの大きな孔が、このプラグの全細孔容積の少なくとも約10%を有しているカラム。
2. 該マクロ細孔ポリマープラグが約3から90%の開塞率を有している請求の範囲1のカラム。
3. 該骨がマクロ細孔ポリマーの2種以上の異なるプラグを含んでいる請求の範囲1のカラム。
4. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルモノマーのポリマーを含んでいる請求の範囲1のカラム。
5. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの共重合体を含んでいる請求の範囲1のカラム。
6. (i) 開塞率を閉じた骨に、ポロゲンを含んでいる隙間した重合混合物を加え、(ii) この混合物を重合させることでマクロ細孔有線ポリマープラグを生じさせ、そして(iii) このマクロ細孔ポリマープラグを洗浄することでそのポロゲンを除去し、そして約200nm未満の直径を有する小さい孔と約600nm以上の直径を有する大きな孔を含んでいるプラグを生じさせる段階を含む、請求の範囲1のカラムを製造する方法。
7. 該重合混合物を少なくとも2つの部分として加え、これらの部分の各々に関して、次の部分を添加するに先立って重合を実施する請求

の範囲6の方法。

8. 少なくとも2種の異なる重合混合物を連続的に加え、これらの混合物の各々に関して、次の混合物を添加するに先立って重合を実施する請求の範囲6の方法。
9. 該洗浄段階を、該プラグを装置の中に置きながら実施する請求の範囲6の方法。
10. 最初に装置から該プラグを取り出し、このプラグを洗浄した後、このプラグをその骨に戻すことによって、該洗浄段階を実施する請求の範囲6の方法。
11. 該プラグを装置に戻した後、このプラグを断面させる請求の範囲10の方法。
12. 該重合混合物がポリビニルモノマー、開閉およびポロゲンを含んでいる請求の範囲6の方法。
13. 該重合混合物が更にモノビニルモノマーを含んでいる請求の範囲12の方法。
14. 該重合混合物が更にポリマーを含んでいる請求の範囲12および13の方法。
15. 該ポリマーが可溶ポリマーである請求の範囲14の方法。
16. 該ポリマーが不溶ポリマー粒子である請求の範囲14の方法。
17. 該ポリマー粒子を、該重合混合物と組み合わせるに先立って、この重合混合物に親和性を示さない液体に浸漬する請求の範囲16の方法。
18. 該不溶ポリマー粒子がマクロ細孔性を示し、そしてこれら、該重合混合物内に存在しているのと同じモノマーから生じさせる請求の

範囲15の方法。

19. 請求の範囲1から5のカラムを用いることを含む、液体クロマトグラフィーによる化合物の分離方法。
20. 硬質骨と、カラム内に配置されておりそしてこのカラムの断面領域を横切って伸びているマクロ細孔有線ポリマーの少なくとも1種の連続プラグを含んでいるカラムにおいて、このプラグが、約200nm未満の直径を有する小さい孔と約600nm以上の直径を有する大きな孔を含んでおり、そして有線骨隙および水から選択される液体を少なくとも約200cm/時の線形流速および約30MPa (4,500psi) 未満の圧力で通過させるカラム。
21. 大きな孔が、該プラグの全細孔容積の少なくとも約10%を有している請求の範囲20のカラム。
22. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルモノマーのポリマーを含んでいる請求の範囲20のカラム。
23. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの共重合体を含んでいる請求の範囲20のカラム。

明 細 書

マクロ細孔ポリマー媒体が備わっているカラム

発明の背景

通常のクロマトグラフィーは、一般に、クロマトグラフィー分離を要させるべきサンプルを球形ビードの床に塗布することによって実践されている。これらのビードは、通常、これらのビード間の間隙体積を最小限にしてこのカラム効率を増大させるような隙間で、管またはカラムの中に充填されている。球形粒子を製造する伝統的な合成ルートは修飾混合物によるものである。この種類の重合におけるモノマーの選択は、その分離後に溶解性を示さないモノマー類に限定されている。従って、この技術を含めてのポリマー類に適用することは不可能である。この技術の実施は容易であるが、得られるビードはむしろ多分散したサイズを有するものである。従って、充満するに適した均一なサイズを有するビードを得るには、一般に、時間のかかるサイズ分別を繰り返して実施する必要がある。その結果として、この様式におけるカラム充填は時間を必要とすると共に高価である。

カラム効率を改善するには小さい粒子またはビードを用いる方が望ましい、と言うのは、このようなビードは一般に間隙体積が小さくなるように充満するのがより容易であるからである。小さい多孔質ビードの合成は、例えば微粒子を用いた重合などによって達成され、そしてこのようなビードが、より高い効率を達成する目的でカラム内で用いられてきた。しかしながら、更に小さいビードを用いると、これらのビードが小さくならねばならない必要とされるカラムが短くなることから、問題が生じてきた。カラムが短くなることに関連した特定の問題は解決される。短く

した板を直線を大きくすることによって矯正しない限り、そのように歪んだカラムのカラム体積が小さくなってしまふ(これによって分離容量が小さくなる)。分離に関しては、通常、これらのピードが有する孔直径が分離すべき高分子のスタックス (Stacks) 直径の3倍以上である時、満足の結果が達成される。この結果として、これらのピードは非常に高い多孔性を示す必要があり、従って、これらは低い機械強度を示すことから実用するの益々困難になる。このような複雑な関係から、液クロマトカラムの速度および分解能を増大させる目的で粒子サイズを更に小さくする方向は向かへていっていると見られる。

最も良好な品質を示すクロマトグラフィー充填物は、約50から60%の空隙率を有している。この多孔容積を増大する方法は知られているが、その得られる高い多孔性を示す充填物が非常に数少ない傾向を示すことから、それらが示す機械的性質はHPLCで期待されている基準に到達していない。カラム効率を改良する目的で他の通常でないアプローチが試みられてきた。

例えば、Bio Radは、重量比をクロマトグラフィー分離する目的で、テフロン (Teflon) (商標) ポリマーウェブ (全体積の10%) の中にスチレンジビニルベンゼンのイオン交換樹脂 (90%) を含ませた0.4mm厚の軟質膜であるBio-Rad (商標) を製造している。テフロンポリマーを10%厚い場合、これがピード間に完全に位置している時さえも、それらの間の空隙空間を完全に占めることは不可能であり、結果的にいくらかの空隙が残る。これが、このカラムがそれの理論的最大限度に到達するのを邪魔している。

PCIT公報90/07/965には、重力流れ (加圧流れではなく) で用い

して、カラム効率は通常から数倍のものである。

従って、これらのアプローチのいずれも、通常の充填床クロマトグラフィーカラムに関連した問題を完全に解決するものではない。

ヨーロッパ特許第0.921.624号には、適切な位置にキャスト、即ち液状の膜内に直接、或は超微粒子状の膜内の膜として段階的に、更に分離用媒体を適切な位置に維持している多孔質のセパレータ、即ち加圧プラグが置かれているクロマトグラフィーカラムが開示されている。このセパレータ製プラグは分離媒体ではない。

従って、本発明の目的の1つは、先に述べておき本質的に全く同様の体積を有していない、クロマトグラフィーカラムで用いるに適した分離用媒体を製造することにある。

本発明の別の目的は、容易かつ安価に製造可能なクロマトグラフィーカラムを製造することにある。

本発明のさらなる目的は、このカラムの最終使用に適合させる目的でこの分離用媒体を注文に含めることが可能なように、多様なモノマーからポリマー状の、即ち有機の分離用媒体を製造することにある。

さらなる目的は、非常に大きな物、例えば蛋白質類、ミセルまたは核酸などを分離するための分離用媒体とより固い連続床を製造することにある。このような大きな物の特定物は、通常の充填カラムを用いたのでは、その充填された粒子間の空隙空間におけるせん断力により劣化を受け、そこから分離不可能である。

本発明の上記およびさらなる目的は、本発明の下記の説明から明らかになるであろう。

発明の要約

るに適切なクロマトグラフィーカラム用プラグ (plug) が開示されている。このプラグは、液体力学的流れを可能にするに充分な大きさを有する亀裂とチャンネルが含まれている。このプラグは、アクリル酸とメチレンビスアクリルアミドとの重合混合物を含んでいる。このPCIT公報90/07/965出版の2か月後に出版されたKjerteneff, J. Chromatograph, 472 (1989)、273-275には、このPCIT公報の中に開示されているプラグは圧力をかけると破壊することからこれをクロマトグラフィーで用いるのは不可能であると開示されている。この問題を解決する目的で、Kjerteneffは、このプラグを効率的に圧縮しそれの分解能と共に圧力に耐える能力を増大させることを提議している。このような圧縮は、本発明、このプラグの中に不均一なチャンネルを生じさせるものであり、その結果として、理想的なカラム効率よりも低くするものである。

米特許第4,889,632号、4,923,610号および4,952,349号 (SpecieB) には、いわゆる「黒クロマトグラフィー」のための黒色マクロ細孔膜が開示されている。これらの膜はポリマーのマクロ細孔シートから打ち抜かれており、またそれを用いるためのカートリッジはカラムとは異なっており、カラムではない。実際、黒クロマトグラフィーはクロマトグラフィーではない、と言うのは、その分離された分子がその膜を通過する時、繰り返し吸着-脱吸着は全く存在しないからである。

Komakura他, J. Nat. Sci., 24 (1989)、1809-1813には多孔質ポリマー複合体カラムが開示されている。このポリマー材料は、-78°Cの液相キャスティング装置によりモノマー層の組合わせから製造されている。その得られるポリマー材料は、直径が10から40ミクロンに及ぶ極めて大きな穴を含んでおり、サブミクロンの孔ではない。この結果と

従って、本発明は、連続カラム、好適にはクロマトグラフィーカラムを意図したものであり、これは、内部断面積を適切でそのカラムの中に配置されている遊離したマクロ細孔ポリマー材料から成る少なくとも1種のプラグを含んでいる。この得られるカラムはクロマトグラフィーカラムとして有効性を示すと、これはまた、液体を通過させる能力を有していることから、種々の脱脂過程、断続過程および吸脱過程で利用される。本発明に従うマクロ細孔ポリマー材料は、約0.1mL/g以上、好適には0.5mL/g以上の吸脱容量 (その穴の中に非溶媒性溶媒を吸着する能力) を示す。これらの材料は、小さい、即ち直径が200nm未満の孔はではなく、大きな孔、即ち直径が少なくとも約600nmの孔も含んでいる。このカラムの内部断面積を適切で得られるマクロ細孔媒体のプラグは、少なくとも約5mmの厚さを有している。この厚さによって、このプラグは異なる層から区別される。このプラグは、好適には、約5から20mmの範囲の厚さ (長さ) を有する長く伸びた塊状材料である。単一プラグを用いるのが現在の所好であるが、特に複数のプラグが異なる組成または構造を有している場合、多数のプラグを用いることも可能である。従って、多数のカラムを列状に用いる代わりに、それらの吸脱特性を単一の連続カラム内に工学的に組み込むことも可能である。このように、上方のプラグに、イオン組と対立するイオンクロマトグラフィーに適した抑制特性を与え、そしてその次のプラグに、希望の分離を行わせることも可能である。

このマクロ細孔ポリマープラグは、ポリビニルモノマー、或はより好適にはポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの混合物を、開裂剤およびポロゲン (porogen) の存在下で重合させることを証由して製

ルアセート、ビニルピロリドンおよびそれらの混合物が含まれる。このポリビニルモノマー、またはポリビニルモノマーとモノビニルモノマーは、一般に、この重合混合物中の約1から50体積%の量、より好適には約20から40体積%の量で存在している。

使用するポロゲンは、種々の異なる種類の材料から選択される。例えば、適切な炭化水素類には、脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、エステル類、アルコール類、ケテン類、エーテル類、可溶ポリマー類の液体およびそれらの混合物が含まれる。このポロゲンは、一般に、この重合混合物中の約40から90体積%の量、より好適には約50から80体積%の量で存在している。

これらのモノマー類と組み合わせ、可溶ポリマー類および不溶ポリマー粒子を用いることができる。これらのポリマー類は、重合に先立ってその重合混合物の中に添加される。これらの可溶ポリマー類は、ブラグに溶解することによって、そのブラグが生じた後のブラグから溶出してくる。これらの可溶ポリマー類は、最終ブラグの強度を増大させるポリマー化剤としても働く。ここで用いるに適切な可溶ポリマー類には、スチレンまたは異置換スチレン、アクリレート類、メタアクリレート類、ジメチル、塩化ビニルおよび酢酸ビニルの如きモノマー類の未置換ポリマー類または共重合体が含まれる。重合中に体積が収縮するのを防ぐ目的で、不溶ポリマー粒子を用いる。この重合混合物内のモノマー類の体積が膨らみ過ぎ、重合した時の体積収縮が小さくなる。ここで用いるに適切な不溶ポリマー粒子には、同じモノマー類の置換共重合体であるマクロ孔ポリマー粒子が含まれる。しかしながら、その重合混合物を生じさせる目的で用いたのと同じモノマー類から生じ

させた不溶ポリマー粒子を用いるのが、適合性の点から現在のところ好適であり、これとそれらを組み合わせる。これらのポリマー粒子は、典型的に1から1,000ミクロメートルの直径を有している。このポリマー粒子の重合物は同じ粒子サイズを有している必要はない。実際、異なる大きさを有するポリマー粒子を用いる方が好適であり、従って現在のところ好適である。必要ではないが、これらのポリマー粒子を、フリーラジカル重合を禁止する防止剤が入っている必要はない。重合混合物に炭化性を示さない液体に溶解してもよい。これは、孔の詰まりの原因となると共に有効にそれらをその分離過程から取り去るマクロ孔粒子内部の重合を防止する目的で行うものである。この防止剤は、その時、この分離過程に真摯に等しい無孔質ボールを含んでいる。適切な防止剤には、塩化第二銅および亜硝酸ナトリウムが含まれる。この防止剤は、全粒子重量を基準にして約0.001から1重量%の量、より好適には約0.1から1重量%の量で存在している。

好適には、この重合混合物で用いるに先立って、これらのポリマー粒子の脱気を行う。これは、本分野で知られている通常の手段のいずれかを用いて達成される。しかしながら、任意に重合防止剤が入っている水中にこれらの粒子を浸漬した後、約5から20分間の加熱適切な期間、水流ポンプ装置下にある水ポリマー粒子混合物を維持することによって、その孔から空気を除去するのが現在のところ好適である。次に、過剰水を透過して除去してもよい。可溶ポリマー類は、一般にこの重合混合物の約5から40体積%の量で存在しており、そして不溶ポリマー粒子は約5から50体積%の量で存在している。

重合を開始させる目的で、フリーラジカルを発生する通常の重合開始

剤を用いることができる。適切な開始剤の例には、0,0-1,1-ル-0- (2-エチルヘキシル) モノアゾキシカルボネート、ジプロピルパーオキシカルボネートおよびペンゾイルパーオキシドの如きパーオキシド類、並びにアゾビスイソプロピロニトリル、2, 2'-アゾビス (2-アミソプロパン) ジヒドロリドおよび2, 2'-アゾビス (イソブチラミド) 二水化合物が含まれる。ブラグ内の孔分率を調節する手段として開始剤の選択が用いられることが見いだされた。特に、アゾビスイソプロピロニトリルを用いて重合を実施する時、その大きな孔は全細孔容積の50%以上であるが、それをペンゾイルパーオキシドに置き換えると、その大きな孔の容積は全細孔容積の20%にまで低下した。この開始剤は、一般に、該モノマーの約0.2から5重量%の量でその重合混合物内に存在している。

この重合混合物をその管に入れるに先立って、この混合物の中に存在している炭素を除去するに充分な期間、真空の如き不活性ガスをこの混合物の中にバブリングするなどの加え通る手段で、この混合物の脱気を行う。この重合混合物を脱気して脱気を行った後、これを、適切な温度で干渉処理を付した管の中に入れる。この重合混合物の全部を加えた後、重合させて第一ブラグを生じさせる。例として、この重合混合物を分注して加えてもよく、各添加後から次の添加を行うまで重合を行う。連続した添加で同じモノマー混合物を用いると、第一ブラグが得られる。2層以上の異なる重合混合物を連続して用いると、この方法では、2層以上の異なるブラグが生じる。現在のところ好適なものは第一ブラグである、と云うのは、これは現在通常の充填カラムによりよく適合しているからである。多数ブラグ技術を通ずる装置に適用する

のは困難であり、この技術は、1つの単一カラム内に異なる分離媒体を特別に組み合わせることの利点を採用する新規なクロマトグラフィ様式と一種に類似に用いられる。次に、重合を行う準備としてこの管を密封する。

この重合物をその管の中に入れた後、用いる開始剤とモノマー類に応じて、約6から24時間、一般に約50から90℃の温度の通常状態で重合を実施する。この重合は、好適には真空またはアルゴンなどの不活性雰囲気内で実施される。本分野で知られている何らかの手段を用いて熱をかけることも可能であるが、この重合混合物が入っている密封した管を、加熱した浴の中に浸漬するのが現在のところ好適である。重合中に生じる収縮はその孔構造全体に影響を与えるが、この収縮量とその持続は維持される。

重合が完了した後、この固状体のマクロ孔ポリマーブラグを洗浄すること如何なるポロゲン溶媒も除去し、そして適切な溶媒を用いて、存在している如何なる可溶ポリマーも溶解させる。適切な洗浄溶媒には、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、アセトン、テトラヒドロフランおよびジオキサンが含まれる。この洗浄過程は段階的に行われてもよく、例えば、溶媒に浸して水で洗浄した後、再び溶媒で洗浄するか、または溶媒を用いて連続洗浄することによって行われてもよい。この洗浄段階は、好適には、そのマクロ孔ポリマーが詰まっている管を通してその溶媒をポンプ循環することによって実施される。

特定の例として、特にこのカラムの次の使用にとってこのマクロ孔ポリマーに特定の官能基を加えるのが有利である場合、特定の官能基を加えるに適切な材料でこのポリマーを処理することがある。例えば、

このマクロ孔孔ポリマーが重合させたメタアクリル酸グリニンを含む場合、このポリマーとエチルアミンの結合アミンとを反応させること、N-ジエチルアミン-2-ヒドロキシプロピル (DEAHP) が生じ、或は硫酸トリエチルアミンと反応させると第四級トリメチルアミノ (Q) が生じ、また、このポリマーが有するエポキシ基の加水分解を遂行させた後クロム酸と反応させるとカルボキシメチル (CM) が生じ、或は炭酸水素塩-1、4-ジオキサン環体と反応させるとスルホン酸 (SP) が生じ得る。これらの基は、イオン交換クロマトグラフィー使用溶出液分離に必須である。フルコラチン酸、例えばカリウムフルコラチン酸、オクタラチン酸およびヘキサデシラチン酸などと反応させることにより、このマクロ孔孔ポリマーに疎水性を与えることができる。この塩の基は、疎水相互作用における分離および逆相モードに必須である。また、このポリマーを、単一化合物または小さい群の化合物に特異的な基別 (affinity) と反応させて、これをアフィニティークロマトグラフィーで用いることができる。適切な阻害剤は、抗原、染料、酵素、レクチン類、蛋白質および糖類である。同様な様式で、また、他のモノマー類を基とするポリマー類を重合して、余ての様式のクロマトグラフィーで用いることができる。その後、このプラグを適切な溶媒で洗脱するかは1度操作で洗脱してもよい。

この洗脱段階に関係した更に別の代替方法は、その重合したプラグをその管から取り出し、適切な溶媒でそれを洗淨した後、これをその管に戻すことを繰り返している。この戻したポリマーをそのままにしておくか、或はテトラヒドロフラン、1、4-ジオキサン、トルエンまたはハロゲン化炭化水素の如き脂溶性溶媒でそのポリマーを洗淨してその脂溶性

を生じさせることにより、その管の中より広い空間を占めるようにすることができる。

この洗淨段階の後、そのマクロ孔孔ポリマーが用いている管は使用済みが出来る。これは、本分野で知られている通常の技術に従い、連続クロマトグラフィーカラムとして用いられると共に、触媒、診断または検出装置の目的で用いられる。例えば、この管をクロマトグラフィーカラムとして用いてサンプルをそれの成分に分離する場合、このサンプルのための阻体として水または緩衝液を用いることができる。このサンプルが入っている溶液をポンプ送達することにより、それを、その管の中に入っているプラグに送達する。溶媒の特性、例えばpH、イオン強度、有機溶媒含有量などを変化させることにより、分離を遂行させる。この組成の均配は、球形、段階溶媒または封鎖の如き如何なる形態であってもよい。次に、その分離されたサンプルの検出は、本分野で知られている手段を用い、染色技術を用いてそのカラムをそれ自身の管から、或はこのカラムからその成分が留りに溶脱して来る時、このプラグの下流またはこの管の外側で達成される。本発明に従うマクロ孔孔ポリマー分離用装置は、約100から1000の範囲の分離量をする材料の分離に有効性を示す。実質カラムを用いて行われる如何なる分離も本発明のカラムを用いて実施される。

以下に示す非制限的実施例を参照して本発明をここに記述するが、全ての態およびパーセントは、特に明記されていない限り重量である。

実施例 I

底クロに取り付けに選した動きが同様に回っているステンレス鋼製管 (内径直径が、6 mmであり、長さが50 mm) の1つの実

端を、剛製ナットスッパで閉じ、この管を真空パージした後、そのもう一方の末端を、シリコンゴム隔壁で閉じた。4、8 gのメタアクリル酸グリニン、3、2 gのメタアクリル酸エチレン、10、8 gのシクロヘキサノール、1、2 gのデカノール、および0、08 gの7-ポジスリブチロニトリルを混合することによって、重合混合物を調製した。この混合物に酸素を20分間バブリングすることによって、存在している如何なる酸素も除去した。この混合物の0、1 mlを、その隔壁を通してその管の中に入れた後、熱電対で70℃にしたオイルバスの中で加熱することにより、重合を開始させた。7時間後、その管をその面から取り出し、放置して室温にまで冷却した後、その隔壁を取り外した。この時点で、このカラムは、長さが5 mmの固体マクロ孔孔ポリマープラグを含んでいた。このポリマーをメタノールで洗淨した後、この管の両末端をクロマトグラフィー用ナットで閉じ、そしてこのカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けた。最初に、メタノールを異なる流量でそのカラムにポンプ送達した。その管圧は、0、5 ml/分の流量の時0、4 MPaであり、流量が1 ml/分の時0、8 MPaであり、そして2 ml/分の時1、6 MPaであった。次に、この溶媒をテトラヒドロフランに変えた後の管圧は、0、2 ml/分の時0、2 MPaであり、そして2 ml/分の時1、9 MPaであった。この流量に対する管圧の依存性は線形であることが見いだされた。

これらの測定の後、このカラムの底を開けて、溶媒柱を用いてその多孔質ポリマーロードを取り出した。

実施例 II

装置用ストック溶液を0、15 ml用いる以外は実施例 Iと同様な操

作を用いた。この管から取り出した後のプラグの長さは9 mmであった。

このプラグを50 mlの乳酸ブタースの中に入れた後、ジエチルアミンを5 mlを加えた。この内容物を3時間攪拌させた。その重合させたメタアクリル酸グリニン単位のエポキシ基がそのアミンと反応すること、N-ジエチルアミン-2-ヒドロキシプロピル (DEAHP) が生じ、これらの基は、イオン交換クロマトグラフィー使用溶出液分離にとって必須である。この反応が終了した後、このロードをメタノール、水、再びメタノールで洗淨した後、乾燥させる。このDEAHP含有量は1、59ミリモル/gであることが算出された。

この乾燥させたプラグをそのカラム管に戻し、水中に2時間浸漬し、その末端を指で開けた後、1つの末端をHPLCクロマトグラフのポンプに連結する一方、もう1つを検出器に連結しなさいに選いていた。このような構造配置でその管圧を測定した。流量が1 ml/分の時の管圧は0、5 MPaであり、3 ml/分の時のそれは1、3 MPaであり、そして5 ml/分の時のそれは2、2 MPaであった。UV検出器に連結した後の管圧は、0、5 ml/分の流量の時0、4 MPaにまで上昇した。

このカラムを、そのベースラインのずれが生じなくなるまで (20分間)、0、02モル/Lのトリス-HCl緩衝液 (pH=7、3) (緩衝液A) を0、5 ml/分の流量で用い、クロマトグラフィー条件下で洗淨した。0、21 gのシクロヘキサノールC、リソチアム、ミオロビンおよびオボアルブミンが入っている溶液を、ループを通して流入した後、上記ポリマーの濃縮液が吸収するまでに、この管を通して上記緩衝液のポンプ送達を20分間行い、その後、流れの底は全く見ら

れなかった。その収率は全体的であった。次に、勾配溶媒を開始した。この溶剤系を緩速溶媒Aから緩速溶剤B(緩速溶媒Aの中に1モル/Lの塩化ナトリウム)に、10分以内に直線的に変化させた。この予備試験で用いたクロマトグラフィー条件は理想的な条件から選定され、4種の蛋白質全ての分離が確認された。これらの蛋白質の保持時間は、7、4、7、7、7、9および8、1分であった。

実施例1-1

実施例1で用いたのと同じ量の中に、3 mLのステレン、1、2 mLのジビニルベンゼン(85%のDV B)、6 mLのベンジルアルコールおよび0、05 gのベンジールパーオキサイドから成るストック混合物を0、3 mL注入した。脱気した後、この管を閉じ、そして真空を70℃で24時間運行させた。銅製ブランジャーを用い、長さが18 mmの多孔質ポリマープラグをその管から押し出した後、メタノールをいくつかに分けて、その中で4日間洗浄した。この洗浄後でもこのプラグは元の管に合致していた。この層相をテトラヒドロフランに取換えると、これはそのプラグの膨張を生じさせた。約20分後、このプラグの直径は、その管の直径以上になった。次の溶媒交換でメタノールを用いて、このプラグを元の大きさにまで収縮させた。その後、このプラグをそのカラムに押し、そして再びメタノールをテトラヒドロフランに交換した。このカラム内における膨張を管径の拡大として監視し、この管径は、この管の狭い部分がまだメタノールで満たされている時の0、3 MPaから始まって、この溶媒のいらいらが交換された後の10 MPa以上にまで上昇した。その時点で、この装置に関する何らかの可能な損傷が生じるのを防止する目的で、この測定を終了した。

ニトリルを混合することによって、重合混合物を調整した。この混合物を水ポンプ圧下で15分間管壁処理した後、更に15分間真空をパブリッシングすることによって、溶解している気体を除去した。このカラムの管を、上記重合混合物で完全に満たした後、この管を密封した。この真空を70℃の水浴内で8時間運行させた。この重合が完了した後、このカラムをその管から取り出し、そして周囲温度にまで冷却させた。長さが50 mmであるそのロッドを洗浄する目的で、このカラムの両末端に在るスッターをクロマトグラフィー用箱が手に交換した後、このカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けた。最初に、メタノールを異なる流量でそのカラムにポンプ輸送することとこのロッドの洗浄を行うと同時に、このカラムを通る流れを記録した。この管径は、0、5 mL/分の流量の時0、8 MPaであり、1 mL/分の時1、9 MPaであり、2 mL/分の時4 MPaであり、そして5 mL/分の時13 MPaであった。この管径は、この洗浄後全体的を通して変化しなかった。このカラムを通してポンプ輸送したメタノールの全量は200 mLであった。

このカラムをそのクロマトグラフから取り出した後、このカラムの入りに1 mLのジエチルアミンを注入した。このカラムの入りと出口を、デルリン(delrin) プラグで閉じた後、このカラムを、熱源で60℃にした水浴の中に3時間入れた。次に、このカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けた後、その両末端のアミンをメタノールで洗浄した。この改質処理中、このプラグは膨張し、そしてこの膨張したポリマーが部分的にその孔を占める。これは、この洗浄過程を開始した時の管径が高いことで説明される。この管径は、流量が2 mL/分の時3

実施例1-V

真空を10分間パブリッシングすることによって、実施例1に記述したモノマー類の混合物を脱気した。マクロ細孔ポリ(メタクリル酸グリシジル-コ-メタクリル酸エチレン) ビードを真空水中に浸漬した後、この水-ポリマー混合物を水ポンプ真空下に10分間置くことによって、それらが有する孔から空気を除去した。次に、これらのビードを真空を通して過剰水を除去した。次に、これらのビードの約1 mLを、連続的に真空パージしている丸底ガラスビンの中に仕込み、上記脱気した重合混合物を0、5 mLに加え、この分岐線がガラス棒を保持した。このビンを密封した。その真空を70℃で6時間運行させた。この重合が完了した後、このビンの内容物は均一であるように見えた。そのメタクリル酸グリシジルが有するエポキシ基とそのガラス表面が有するシラン基とが反応することから、このビンの膨張を生じさせることなくこのビンからそのブロックを取り出すのは不可能であった。そのようにしても、そのブロック表面からそのガラスを剥離させるのは非常に大変であった。このブロックは、小さい片に割れる傾向を示さない。これはその元のビードとそれに適用している重合体とこのプラグメントは分離する傾向を示さなかった。

実施例V

ステンレス鋼製カラム(内部直径が8 mmであり、長さが50 mm)の1つの末端を密封し、アルゴンでパージ洗浄した後、そのもう一方の末端をシリコンゴム隔壁で閉じた。3 mLのメタクリル酸グリシジル、2 mLのメタクリル酸エチレン、72 mLのシクロヘキサノール、18 mLのデカノール、および0、6 gのアジソビスプロ

2 MPaであり、そして1 mL/分の時15 MPaであった。メタノールを用いて50分間洗浄した後、水-メタノール1:1混合物を用いた。この管径は、0、5 mL/分の流量の時20 MPaにまで上昇した。更に1時間後、このメタノール-水混合物を酢酸水に交換した。この管径は、流量が0、5 mL/分の時の6、6 MPa、そして1 mL/分の時の12、7 MPaにまで低下した。最後に、このカラムを0、02 mL/分のトリス-HCl(緩速溶媒B(H=7、6)、緩速溶媒A)で洗浄した。流量が0、5 mL/分の時の管径は5、7 MPaであった。

ニトリル-アルブミン(8 mg/mL)、ニトリル-卵白蛋白質(16 mg/mL)およびモデル蛋白重合混合物(16 mg/mL)が入っている溶液(2 L)を、ループを通して注入した後、緩速溶媒Aの流れの中で、その凝縮マクロ細孔ポリマープラグの上に10分間放置させるままにした。緩速溶媒B(緩速溶媒Aの中に1モル/LのNaCl)の適度勾配を用い、0、5 mL/分の流量で上記蛋白の層を行った。図1-3に示す異なるクロマトグラムは、それぞれアルブミン(図1)、卵白蛋白質(図2)およびモデル蛋白重合(図3)に関するものである。218 nmの波長でこれらの検出を行った。勾配クロマトグラフィーに適宜の如く、用いた溶媒組成物の勾配から、図1-3のベースラインは平らでない。これらの図内の実線はクロマトグラムであり、そして溶媒組成物の変化を示す目的で、点線を加えた。

実施例V-I

直径が8 mmであり長さが50 mmのステンレス鋼製の1つの末端をシリコンゴム隔壁で閉じ、そしてもう一つの末端を液体状シリコンゴムプラグで閉じた。3 mLのステレン、2 mLのジビニルベンゼン、7、

5 mL のドデカノールおよび、5 g のアソブイソブチロニトリルを混合することによって、重合混合物を調製した。重量を15分間バージすることによって、この重合物の脱気を行った。この重合物を、その隔壁を通してその調製管の中に注入した後、熱電対で70℃にした空気浴内でその管を加熱することにより、重合を開始させた。20時間後、この管をその熱浴から取り出し、そして周囲温度にまでゆっくりと冷却した。このカラムの両末端にあるストッパーを取り外して、標準的なクロマトグラフィーカラム装置に取り替えた。このカラムをクロマトグラフに取り付けた後、メタノールを用い、0.1 mL/分の流量で1時間、そして1 mL/分の流量で30分間洗浄した。この2番目の洗浄操作中の背圧は一定して、0.2 MPaであった。

このカラムの出口を開け、そして20 mL/分の流量でメタノールを用い、このカラムからその混合したロッドを押し出した。このロッドを室温で乾燥し、粉砕して小さい片にした後、水相ポロシメトリー (porosimetry) を用いて、このポリマーの孔サイズ分布を評価した。この分布曲線を図4に示すが、これは明らかに、200 nm未満の小さい孔と1,000 nmの大きな孔の両方が存在していることを示している。

実施例 V-1

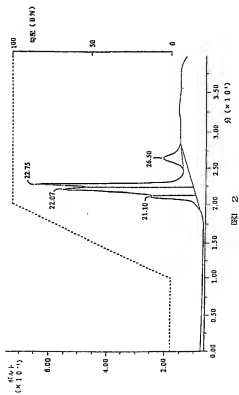
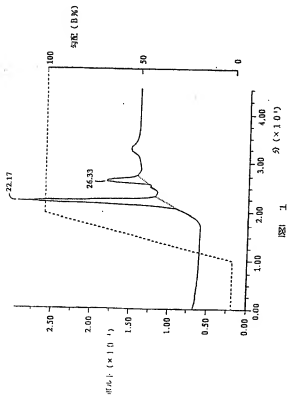
メタノールを用いた洗浄操作が完了した後、このカラムの出口部を手でU/V検出器に連絡する以外は、実施例 VI の操作に従ってカラムを調製した。このカラムを、アセトニトリル-水の1:1の混合物を用い、1 mL/分の流量で2時間平衡にした。次に、この平衡を継続した段階で25 mL/分の流量にまで上昇させ、そしてその背圧を記録した。その結果を図5に示すが、ここでは、その流量に対する背圧の線形依存

が明らかである。この結果は、クロマトグラフィーで用いるに適切な背圧、即ち約40 MPa (6,000 psi) 以下の範囲のまま、非常に高い流量でこの連続ロッドカラムが有効であることを立証している。

チクロロムC、ミオグロビンおよびニトリル部アルブミンが入っている溶液をこのカラムに注入した後、勾配連続クロマトグラフィーを開始させた。水中20%のアセトニトリルから水中60%のアセトニトリルへの線形勾配を用いた。このアセトニトリル濃度をその開始濃度から最終混合物に酸化させる時間 (勾配時間) は、5 mL/分の流量で2分、10 mL/分で2分、15 mL/分で1.3分、そして25 mL/分で0.8分であった。このクロマトグラムを図6に示す。

比較実施例 A

そのステンレス調製管を軟質のポリ (テトラフルオロエチレン) 管に置き換える以外は実施例 I の操作を繰り返す。そのポリマープラグが動いているその得られる溶液のクロマトグラフに連絡した場合、40 MPa (6,000 psi) の非常に高い圧力でも、このプラグを通るテトラヒドロフランの流れは本質的に全く観察されなかった。実施例 B と同様に、この管を切り離してそのプラグを取り出すことによってこのプラグの孔サイズ分布を評価した時、約200 nm以上の孔は全く見られなかった。



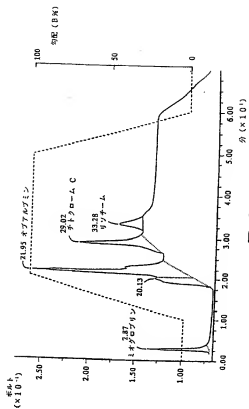


図 3

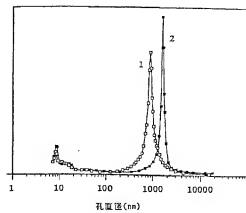


図 4

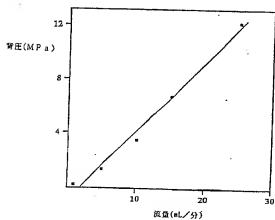


図 5

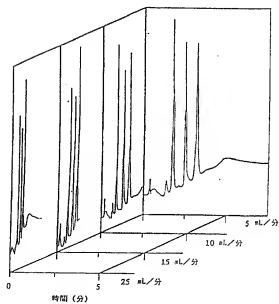


図 6

平成6年4月15日

明 細 書
マクロ細孔ポリマー媒体が備わっているクロマトグラフィーカラム

特許庁長官 藤 生 義 殿

1. 特許出願の表示

PCT/US92/09100

2. 発 明 の 名 称

マクロ細孔ポリマー媒体が備わっているカラム

3. 特 許 出 願 人

住 所 アメリカ合衆国ニューヨーク州14850イサカ・

ソーラッドドライブ20・スイート105

名 称 コーネル・リサーチ・フアウンデーション・インコ
ーポレーテッド

4. 代 理 人

住 所 東京都港区赤坂1丁目9番15号

氏 名 (8078)弁理士 小 田 島 平 吉

電 話 3585-2256



5. 補正書の提出年月日

1994年1月13日

6. 添付書類の目録

(1) 補正書の写し(翻訳文)

1通



た。カラムが短くなることに関連した特定の問題は解決される。短くした長さを直線と大きくすることによって修正しない限り、そのように短くしたカラムのカラム体積が小さくなってしまふ(これによって分離容量が小さくなる)。分離に關しては、通常、これらのビードが有する孔道量が分離すべき高分子のストック (Stocks) 直徑の3倍以上である時、最良の結果が達成される。その結果として、これらのビードは非常に高い多孔性を示す必要がある。従って、これらは低い機械強度を示すことから充填するのが困難になる。このような技術的限界から、液クロマトのカラムの直線および分解能を増大させる目的で粒サイズを更に小さくする方向は終点に到っていると思われる。

現在良好な品質を示すクロマトグラフィー充填物は、約50から60%の空隙率を有している。この細孔容積を増大する方法は知られているが、その得られる高い多孔性を示す充填物が非常に数に欠ける傾向を示すことから、それらが示す機械的特性はP L Cで期待されている基準に到達していない。カラム効率を改善する目的で他の通常の微小アプローチを試みられてきた。

例えば、Ble Redは、蛋白質をクロマトグラフィー分離する目的で、テフロン (Teflon) (商標) ポリマーウェブ (金体積の10%) の中にスチレン/ビニルベンゼンのイオン交換樹脂 (90%) を含ませた0.4mm厚の軟質版であるBle-red (商標) を製造している。テフロンポリマーを1%用いた場合、これらがビード間に完全に位置している時でさえも、それらの間の隙間空間を完全に占めそこそこ不可能であり、粒子間にいくらかの空隙が残る。これが、このカラムがその理論的に最大効率に到達するのを邪魔している。

発明の要旨

通常のクロマトグラフィーは、一般に、クロマトグラフィー分離を受けてべきサンプルを球形ビードの床に通すことによって実施されている。これらのビードは、通常、これらのビード間の空隙体積を最小限にしてこのカラム効率を増大させるような後式で、管またはカラムの中に充填されている。球形粒子を製造する伝統的な合成ルートは無差別によるものである。この種類の集合におけるモノマー種の選択は、その分離能に溶解性を示さないモノマー間に限定されている。従って、この技術を用いたポリマーに適用することは不可能である。この技術の実施は容易であるが、得られるビードはむしろ多量にサイズを有するものである。従って、充填するに適した均一なサイズを有するビードを得るには、一般に、時間のかかるサイズ分別を繰り返して行う必要がある。その結果として、この様式におけるカラム充填は時間を必要とすると共に高価である。

カラム効率を改善するには小さい粒子またはビードを用いる方が望ましい、と言うのは、このようなビードは一般に空隙体積が小さくなるように充填するのがより容易であるからである。小さい多孔質ビードの合成は、例えば塩基を用いた場合などによって達成され、そしてこのようなビードが、より高い効率を達成する目的でカラム内で用いられてきた。しかしながら、更に小さいビードを用いると、これらのビードが小さくなければならない程必要とされるカラムが短くなることから、問題が生じてき

PCT公開第 96/07965には、重力流れ (加圧流れではなく) で用いるに適切なクロマトグラフィーカラム用プラグ (plug) が開示されている。このプラグは、液体力学の流れを可能にするに充分な大きさを有する亀裂とチャンネルが含まれている。このプラグは、アクリル酸とメチレンビスアクリルアミドとの重合混合物を含んでいる。このPCT公開第 96/07965出版の2ヶ月後に出版されたJortzen等、J. Chromatograph y, 473 (1989)、273-275には、このPCT公開の公開に開示されているプラグは圧力をかけると破壊することからこれをクロマトグラフィーで用いるのは不可能であると開示されている。この問題を解決する目的で、Jortzenは、このプラグを強力に圧縮してその分解能と共に圧力に耐える能力を増大させることを開示している。このような圧縮は、本来、このプラグの中に不均一なチャンネルを生じさせるものであり、その結果として、理論的なカラム効率よりも低くなるものである。

米国特許第4,838,632号、4,922,610号および4,923,349号 (Svec) には、いわゆる「膜クロマトグラフィー」のための薄膜マクロ細孔膜が開示されている。これらの膜はポリマーのマクロ細孔シートから打ち抜かれており、またそれを用いるためのカートリッジはカラムとは異なっており、カラムではない。実際、膜クロマトグラフィーはクロマトグラフィーではない、と言うのは、その分離された分子がその膜を通過する時、種々異なる吸収-脱吸段階は全く存在しないからである。

Kunakura等、J. Nat. Sci., 24 (1989)、1309-13には多孔質ポリマー複合体カラムが開示されている。このポリマー材料は、-78°Cでの放射状キャスト重合によりモノマー間の組みあわせから製造されている。その得られるポリマー材料は、直徑が10から40ミクロンに及ぶ

極めて大きな穴を含んでおり、サブミクロンの孔ではない。その結果として、カラム効率も理想から程遠いのである。

従って、これらのアプローチのいずれも、通常の充填床クロマトグラフィーカラムに関連した問題を完全に解決するものではない。

コーロップ特許第8,231,684号には、適当な位置にキャスト、即ち床クロマトグラフィーに直接にか、或は超超厚度クロマトグラフィーの膜として間接的に、即ち分岐用媒体を適当な位置に維持している多孔質のセラミック、即ち炭素プラグが埋められているクロマトグラフィーカラムが提示されている。このセラミックプラグは分岐用媒体ではない。

米国特許第5,019,270号には、溶剤、特に生物学的材料混合物の高分分解および高分離能を可能にするとして主張されている薄層クロマトグラフィー方法およびマトリックス構造が提示されている。この方法は、特別に設計されたクロマトグラフィーマトリックスに液体を高流量で通すことを伴うものである。これらのマトリックスは、相互連結している1番目と2番目の膜の孔を規定しているときに、2番目の膜の孔の一面と其隣接膜における溶剤浸透層のための高い表面積を規定している。この1番目と2番目の膜の孔は、粒子間の割れ目およびこれらの粒子間の通し孔 (throughpores) として具体化されている。これらの孔は、造成される高い液体流量において、両方の膜の孔の中に対流流が生じ、そしてこの対流流量がその2番目の膜の孔内の物質拡散率を超えるような寸法を有している。このアプローチは、活性を示す表面からそれへの対流と拡散の物質移動を対にすることで、通常に予測されるバンドスプレッディング (bandspreading) を生じさせることなく流速の増大を可能にするものである。

を有しておりそしてこれらの大きな孔がその全細孔容積の10%以上、好ましくは少なくとも20%以上を有している分岐用媒体をインサイチュウで成功裏に生じさせるものではなかった。従って、本発明の目的の1つは、密に詰まっており本質的に全く閉鎖状態を有していない、クロマトグラフィーカラムで用いるに適した分岐用媒体を製造することにある。

本発明の別の目的は、容易かつ安価に製造可能なクロマトグラフィーカラムを製造することにある。

本発明のさらなる目的は、このカラムの最終使用に適合させる目的でこの分岐用媒体を注文に合わせることも可能にように、多様なモノマー類からポリマー状の、用有種の分岐用媒体を製造することにある。

さらなる目的は、非常に大きな物、異化蛋白質複合体、ミセルまたは核酸などを分離するための分岐用媒体となり得る連続床を製造することにある。このような大きな物の特定物、或通常の充填カラムを用いたのでは、その充填された粒子間の閉鎖空間におけるせん断力による劣化を受けることから分離不可視である。

本発明の上記およびさらなる目的は、本発明の下記の説明から明らかになるであろう。

発明の開示

従って、本発明は、液体クロマトグラフィーに適切な連続カラムを意図したものであり、これは、内部断面径を抜いてそのカラムの中に配置されている連続したマクロ細孔ポリマー材料の少なくとも1種のプラグカラムをその中に含んでいる。この導かれるカラムはクロマトグラフィーカラムとして有効性を示す共に、これはまた、液体を通過させる能力を有していることから、種々の触媒過程、診断過程および吸収過

度利用される。米国特許第1,186,730号には、親水性マクロ細孔重合体のインサイチュウ製造が提示されている。エチレングリコールのビスメタクリレート、エチレングリコールのモノメタクリレート、フリークシカル鎖断剤、およびベンゼンまたはトルエンから成る混合物を、管状成形した構造物の内側で重合させている。電解、このベンゼンまたはトルエンを除去し、そしてこの隙を有さない吸収カラムまたは吸収性装置は、極性および非極性化合物を製造する目的およびガス分析における極性化合物用検出器を製造する目的で用いられる。この重合体はまた、ガス-液クロマトにおける固定相のための基質として、触媒用不活性基質として、並びに吸収および/または透過材料として用いられる。

クロマトグラフィー分岐用媒体をインサイチュウで製造する試みには米国特許第3,541,007号、3,580,843号および3,872,932号が含まれる。

米国特許第3,541,007号には現状の連続気泡フォームが提示されており、この連続気泡孔は単に0.05mmであり、そして好適には、このフォームを使用する目的でカラムの中に入れるに先立って、これを粉砕して粒子を生じさせている。米国特許第3,830,843号には連続気泡ポリウレタン構造物が提示されており、これは、ガスクロマト分岐用媒体として有効であるが、これを液クロマトに用いるには、このカラムに液体をすすばねとされる圧力が極めて高いことを鑑み、それで用いるには充分な大きさの孔が揃っていない。米国特許第3,871,092号には、分岐用媒体を分岐用媒体をクロマトグラフィーカラムの壁に化学的に結合させることが提示されている。

この従来技術のいずれも、液体クロマトグラフィーで有効な分岐用媒体、即ち200nm未満の小さい孔と600nm以上の大きな孔の両方

で利用される。本発明に従うマクロ細孔ポリマー材料は、約0.1mL/g以上、好適には0.5mL/g以上の容積密度 (その孔の中間に非弾性溶媒を収容する能力) を示す。これらの材料は、小さい孔、即ち直径が200nm未満の孔ばかりでなく、大きな孔、即ち直径が少なくとも約600nmの孔も含んでいる。このカラムの内部断面径を横切って伸びるマクロ細孔媒体のプラグカラムは、少なくとも約5mmの厚さを有している。この厚さによって、このプラグは単なる膜から区別される。このプラグは、好適には、約5から200mmの範囲の厚さ (長さ) を有する長く伸びた棒状材料である。薄プラグを用いるのが従来の所好であるが、特に複数のプラグカラムが異なる組成または構造を有している場合、多数のプラグカラムを用いることも可能である。従って、多数のカラムを列として用いる代わりに、それらの吸収特性を単一の連続カラム内に工学的に組み込むことも可能である。次に、上方のプラグカラムに、イオン類と対立するイオンクロマトグラフィーに適した抑制特性を与え、そしてその次のプラグカラムに、所要の分離を行わせることも可能である。

このマクロ細孔ポリマープラグカラムは、ポリビニルモノマーか、或はより好適にはポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの混合物を、開始剤およびポロゲン (porogen) の存在下で重合させることを伴って製造される。この重合混合物はまたマクロ細孔ポリマー粒子を含んでいてもよい。この重合混合物をそのカラムに加えた後、マクロ細孔ポリマープラグカラムが生じるようにその中で重合を開始させる。次に、この有孔ポリマープラグカラムを適切な速度で洗脱することでそのポロゲンを除去する。

本発明の少ないコストで1種のマクロ孔粗孔ポリマーアークラムから多層膜構造を含んでいるグラフトポリマーアークラムは、従来のグラムの充満が以上の特点を有している。例えば、本発明のグラムは、技術的困難が存在していないことから速に製造されている。これにより、非常に高い透過率を得られることで、カメラ部が非常に高くなる。このカメラは、超小型ビデオカメラは容易に組み立てることができることから、カメラが容易である。むしろ、本発明のカメラは、ボロゲンの存在下で実施される簡単な重合方法を用いて製造される。本発明のカメラは、簡単な材料は、この2層用膜構造を生じさせる目的で異なるモノマーを異なる比率に混合することによって製造される。このような多様性は、多数の異なるモノマーを用いることができるようになる。このマクロ孔粗孔ポリマー方法の柔軟性が生じるものとなる。

図の簡単な説明

図1は、実施例Vの連続カラムを用いた時の、ニワトリ卵アルブミンのイオン交換クロマトグラムである。

図2は、実施例Vの連続カラムを用いた時の、ニトリリ酵素蛋白質のイオン交換クロマトグラムである。

図3は、実施例Vの逆相カラムを用いた時の、モデル蛋白質混合物のイオン交換クロマトグラムである。

図4は、実施例V-1で製造したプラグカラムの孔サイズ分布曲線である。

図5は、実施例VIIのプラグカラムによる管圧と流量との関係を示す曲線である。

図 6 は、実施例 V I I のプラグカラムに関する、チトクローム C、ミ

オグロビンおよびニワトリ卵アルブミンの勾配溶液クロマトグラムである。

肝適な型機の詳述

より詳細には、本発明のガラスは、好適には両状であるが長方形または多角形であってもよい。本質的に硬質の質を有している。この質は、金属、ガラスおよび通常のプラスチックを含む、クロマトグラフィーカラムの製造で用いられる通常の材料のいずれから作られていてもよい。この質は限定された程度で柔軟性を示してもよく、これは本質的に堅く、その結果として、この重合反応を行っている間、その管の容積変化は本質的に生じない。この管を長くし開口方として用いる場合、この管の各末端を、流し口と連結するようにした機器で閉じる。本分野で知られている如何なる通常の装置も用いられる。

この資料の中に、コグナク有孔鉄シママがほとんどなくとも1種のコグナクを配置させる。カラム分枝間隔と体とに異なるコグナクに透過するシママをこのコグナクカラム内通過するものとするように、このプラグカラムは、この層の内部断面面積を完全に埋めて滑らかにしている。このプラグカラムは約5mm以上あり、このことからそれらは断片と区別される。これの全体性分は、勿論、このカラムの長さ中に散在している。一般に、このプラグカラムの断面量は、数平方ミクロメートルから数平方センチメートルの範囲であり(利用できる資料の大きさによる)のみに制限される。そしてその長さ、厚さは約5mmから200mmもしくはそれ以上である。このマクロ孔状プラグカラムが占めている層の厚さをはばみず、1つのプラグカラムは多数の異なるプラグカラムの集合と見なされる。2層以上のプラグカラムを多数含む場合、この

の大きなききとびは、その組成は同一かほぼ異なっていない。

このようにあらわす場合、約200nm未満の小さい孔を含んでいくことになるが、通常には孔も孔もある。この階層の一面は、直径が約600nm以上から約3,000nmに及ぶ大きな孔によって与えられる。さらに、これらの大きな孔は、直徑で、約800から2,500nm、より好ましいのは約800から2,000nm、最も好ましいのは約900から2,000nmである。これらの大きな孔は、このブラグカラムの全孔容積の約5と約10の1/50である。これらの大きな孔は全孔容積の約1/5未満の場合、その背圧が高くなる過剰である。好ましいには、これらの大きな孔は、全孔容積の少なくとも約20%を占めている。言うまでもなく、孔が小さければさらに密度を高める媒体から表面積が阻んできることができる。これらの大きな孔は、全孔容積の50%以上を占すことである。小さい孔の大きさは200nm未満、一般に約0.8から200nm、より好ましいは1から約100nmの範囲である。

この得られたプラググラムはまた、抜口装置が通常運転されている圧力、即ち約40MPa（6,000psi）に及ぶ圧力で、このプラググラムを抜口から取り的分別用媒体として利用できる見込みがある。このプラググラムは、1機以上の有機溶媒と水を含んでいる液体組成物で、約30MPa（4,500psi）未満の圧力下で、厚さが150mmのプラグラムを少なくとも約200cm³/時の膨張速度で透過することが可能な如き、均質の取れた適当な多孔粗孔と物理的強度を有している。

これらのカラムを製造する方法は、一般に、(1) ポロゲンが入って

いる脱炭した重合可能混合物を、両端を閉じた硬質管の中に入れ、(2) この混合物を重合させることでマクロ細孔ポリマーブLAGカラムを生じさせ、そして(3) このブLAGカラム(またはブLAGカラム類)を溶媒で洗浄することにより、その製造したマクロ細孔ポリマー内に存在しているハロゲンを除き出す、ことを命じている。

この重合混合物は、最小限、少なくとも1種のポリビニルモノマー、フリーラジカルを発生する開始剤、およびボロンを含んでいる。この混合物はまた、1種以上のモノビニルモノマー類および/または可溶ポリマー類または不溶マイクロ細孔ポリマー粒子を含んでもよい。

[illegible]

用いられ得るモノビニルモノマー類には、スチレン、置換スチレン類（これらの置換基にはクロロメチルが含まれる）、1,8位の以下の炭素原子を有するアルキル、ヒドロキシル、トールチルオキシカルボニル、ハロゲン、ニトロ、アミノ基、保護されているヒドロキシルまたはアミ

ノズ、ビニルアクリレン、アクリレート類、メタクリレート類、ビニルアセテート、ビニルピロリドンおよびそれらの混合物が含まれる。このポリビニルモノマーか、或はポリビニルモノマーとモノビニルモノマーは、一般に、この重合混合物の中に約1から60体積%の量、より好適には約2から40体積%の量で存在している。

使用するポロゲンは、種々の異なる種類の材料から選択される。例えば、適切な粒状ポロゲン類には、脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、エステル類、アルコール類、ケトン類、エーテル類、可溶ポリマー類の溶媒およびそれらの混合物が含まれる。このポロゲンは、一般に、この重合混合物の中に約40から90体積%の量、より好適には約60から80体積%の量で存在している。

これらのモノマー類と組み合わせ、可溶ポリマー類および不溶ポリマー粒子を用いることができる。これらのポリマー類は、重合に先立ってその重合混合物の中に添加される。これらの可溶ポリマー類は、ブラグラムに溶媒を添付することによって、そのブラグラムが生じた後のブラグラムから溶出されてくる。これらの可溶ポリマー類は、最終ブラグラムの強度を増大させる働きで知られており働く。ここで用いられる可溶ポリマー類には、ステレンまたは環状置換ステレン、アクリレート類、メタクリレート類、ジエン類、塩化ビニルおよび動性ビニルの如きモノマー類の未架橋ポリマー類または共重合体が含まれる。重合中に徐々に吸収するのを低くする旨めで、不溶ポリマー粒子を用いる。この重合混合物内のモノマー類の体積が低ければ低い程、重合した時の体積収率が小さくなる。ここで用いられる不溶ポリマー粒子には、同じモノマー類の架橋共重合体であるマクロ孔ポリマー粒子が含まれる。

重合を開始させる旨めで、フリーラジカルを発生する通常の重合開始剤を用いることができる。適切な開始剤の例には、 $\text{O-O-1-アミル-O-2-エチルヘキシル}$ 、モノパーオキシカーボネート、ジプロピルパーオキシカーボネートおよびペンゾイルパーオキシドの如きパーオキシド類、並びにアジソイソプロピロニトリル、 $2, 2'-\text{アゾビス}$ ($2-\text{アミジプロパニル}$)ジヒドロクロライドおよび $2, 2'-\text{アゾビス}$ (イソブチラミド)二水化物などが含まれる。ブラグラム内の孔分布を調節する手段として開始剤の選択が用いられることが見いだされた。特に、アジソイソプロピロニトリルを用いて重合を実施する時、その大きな孔は全細孔容積の50%以上であるが、それをペンゾイルパーオキシドに置き換えると、その大きい孔の容積は全細孔容積の20%にまで低下した。この開始剤は、一般に、該モノマーの約0.2から5重量%の量でその重合混合物内に存在している。

この重合混合物をその型に入れるに先立って、この混合物の中に存在している酸素を除去するに充分な期間、真空の如き不活性ガスでこの混合物の中にバブリングするなどの如き通常の手段で、この混合物の脱気を行う。この重合混合物を調製して脱気を行った後、これを、適切な置き手で両端を閉じた管の中に入れる。この重合混合物の全部を加えた後、真空させて再びブラグラムを圧縮させる。別法として、この重合混合物を分別して凍らせてよく、各種添加物から成る添加を行うまで重合を行う。連続した添加で同じモノマー混合物を用いると、単一ブラグラムが得られる。2段階以上の異なる重合混合物を連続して用いると、この方法では、2段階以上の異なるブラグラムが生じる。現在のところ好適なものでは単一ブラグラムである、と言うのは、これは従来通常の充

まれる。しかしながら、その重合混合物を生じさせる旨めで用いたのと同じモノマー類から生じさせた不溶ポリマー粒子を用いるのが、適合性の点から現在のところ好適であり、これとそれらを組み合わせる。これらのポリマー粒子は、最初約1から1,000マイクロメートルの直径を有している。このポリマー粒子の混合物は同じ粒子サイズを有している必要はない。実際、不規則な大きさを持つポリマー粒子を用いる方が経済的であり、従って望ましいところ好適である。必要ではないが、これらのポリマー粒子を、フリーラジカルを発生させる禁止剤が入っているともよい、重合混合物に反応性をもたない液体に浸漬してもよい。これは、孔の詰まりの原因となると共に有効にそれらをその分離過程から取り去るマクロ孔粒子内部の重合を防止する旨で行うのもである。この方法は、その時、この分離過程に賢敏し得ない無孔質パールを含んでいる。適切な禁止剤には、塩化第二銅および亜硝酸ナトリウムが含まれる。この禁止剤は、全粒子重量を基準にして0.0、0.01から1重量%の量、より好適には約0.1から1重量%の量で存在している。

好適には、この重合混合物で用いるに先立って、これらのポリマー粒子の脱気を行う。これは、本分野で知られている通常の手段のいずれかを用いて達成される。しかしながら、従来の重合禁止剤が持っている水の中にこれらの粒子を浸漬した後、約5から20分間の如き適切な期間、水流ポンプ真空下にこの水-ポリマー粒子混合物を保持することによって、その孔から空気を除去するのが望ましいところ好適である。次に、過剰水を通過で除去してもよい。該可溶ポリマー類は、一般にこの重合混合物の約5から40体積%の量で存在しており、そして不溶ポリマー粒子は約5から50体積%の量で存在している。

ブラグラムによりよく適合しているからである。多数ブラグラム技術で通常の装置に適用するのは困難であり、この技術は、1つの単一ブラグラム内に異なる分離用媒体を特別に組み合わせることを可能にする新規なクロマトグラフィー様式と一緒に最量に用いられる。次に、重合を行う準備としてこの管を密封する。

この混合物をその管の中に入れた後、用いる開始剤とモノマー類に応じて、約6から24時間、一般に約50から90°Cの温度の通常様式で重合を実施する。この重合は、好適には真空またはアルゴンなどの不活性雰囲気内で実施される。本分野で知られている同様の手段を用いて熱をかけることも可能であるが、この重合混合物が入っている密封した管を、加熱した浴の中に浸漬するのが現在のところ好適である。重合中に生じる収縮はその孔構造全体に影響を与えるが、この硬質管の壁との接触は維持される。

重合が完了した後、この固形状のマクロ孔ポリマーブラグラムを洗浄すること如何なるポロゲン溶媒も除去し、そして溶媒を溶媒を用いて、存在している如何なる可溶ポリマーも溶解させる。適切な洗浄液には、メタノール、エタノール、ベンゼン、トルエン、アセトン、テトラヒドロフランおよびジオキサンが含まれる。この洗浄過程は段階的に行われてよく、例えば、溶媒に熱して水で洗浄した後、再び溶媒で洗浄するか、或は溶媒を用いて連続洗浄することによって行われてもよい。この洗浄段階は、好適には、そのマクロ孔ポリマーが閉塞している管を通してその溶媒をポンプ輸送することによって達成される。

特定の場合として、特にこのころの次の使用にとてこのマクロ孔ポリマーに特定の官能基を加えるのが有利である場合、特定の官能基

を加えるに適切な材料でこのポリマーを処理することができ。例えば、このマクロ多孔ポリマーを置き換えたメタアクリル酸グリジリルを含むている場合、このポリマーとジエチルアミンの如きアミンとを反応させるとN、N-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピル (DEAHP) 基が生じ、或は炭酸トリエチルアミンと反応させると炭酸トリメチルアミノ (Q) 基が生じ、また、このポリマーが有するエポキシ基の加水分解を兼ねて生じさせたマクロ孔隙と反応させるとカルボキシメチル (CM) 基が生じ、或は炭酸エステル、1-アジオキサン複合体と反応させるとスルホン酸 (SP) 基が生じ得る。これらの基は、イオン交換クロマトグラフィー使用蛋白質分離に必須である。アルコラート類、例えばカルウムアラート、オクタートおよびヘキサデカートなどとは反応させることにより、このマクロ多孔ポリマーに疎水基を与えることができる。この如の基は、疎水相互作用による分離および逆相模式に必須である。また、このポリマーを、単一化合物または小さい群の化合物に特異的な亲和 (Affinities) と反応させて、これをアフィニティークロマトグラフィーで用いることができる。適切な親和剤は抗体、抗原、染料、酵素、レクチン類、蛋白質および核酸である。同様な様式で、また、他のモノマーを基とするポリマー類を産出しても、全ての様式のクロマトグラフィーで用いることができる。その後、このブラグカラムを適切な溶媒で洗脱的にまたは1段階で洗浄してもよい。

この洗浄段階に開始した更に別の段階では、その置き換えたブラグカラムをその管から取り出し、適切な溶媒でそれを洗浄した後、これをその管に戻すことを擇んでいる。この戻したポリマーをそのままにしておくか、或はテトラヒドロフラン、1-アジオキサン、トルエンまたは

ハロゲン化炭化水素の如き溶剤で溶媒でそのポリマーを洗浄してその孔隙を生じさせることにより、その管の中より広い空間を占めさせるようにすることができ。

この洗浄段階の後、そのマクロ多孔ポリマーが入っている管は使用準備が出来ている。これは、本分野で知られている通常の技術に従い、連続クロマトグラフィーカラムとして用いられるに、乾燥、密封または復元方法の目的で用いられる。例えば、このクロマトグラフィーカラムを用いてサンプルをその成分に分離させる場合、このサンプルのための固体としてまたは最速法を用いることができる。このサンプルが入っている溶媒をポンプ輸送することにより、それを、その管の中に入っているブラグカラムに送す。溶媒類の特性、例えばpH、イオン強度、有機溶媒含有量などを変化させることにより、分離を進行させる。この組成の勾配は、線形、段階または対称の如き如何なる形態であってもよい。次に、その分離されたサンプルの検出は、本分野で知られている手段を用い、染色技術を用いてそのカラムと其自身の管から、或はこのカラムからその成分が管へに溶着して来る時、このブラグカラムの下流またはこの管の外側で達成される。本発明に就くマクロ多孔ポリマー一分離用単位は、約100から100万の範囲の分子量を有する材料の分離に有効性を示す。光導カラムを用いて行われる如何なる分離も本発明のカラムを用いて実施される。

以下に非制限的実施例を参照して本発明をここに記述するが、全ての態およびパーセントは、特に明記されていない限り重量である。

実施例1

底カラムに取り付けたに適した置き手が同案図に描かれているステンレ

ス鋼製管 (内部直径が4.6mmであり、長さが50mm) の1つの末端を、鋼製ナットスクリューで閉じ、この管を真空パッケージした後、そのもう一方の末端を、シリコングラス帽で閉じた。4.8gのメタアクリル酸グリジリル、3.2gのジメチルアクリル酸エチレン、10.8gのシロヘキサメチル、1.2gのデカノール、および0.08gのアゾビスイソプロピロニトリルを混合することによって、重合混合物を調製した。この混合物を重量で20分間予混合することによって、存在している如何なる酸素も除去した。この混合物の0.1mlを、その隔壁を透過してその管の中に注入した後、電熱対で70℃にしたオイルバスの中で加熱することにより、重合を開始させた。7時間後、その管をその管から取り出し、真空下に室温にまで冷却した後、その隔壁を取り外した。この時点で、このカラムは、長さが5mmの筒状マクロ多孔ポリマーブラグカラムを含んでいた。このポリマーをメタノールで洗浄した後、この管の両末端をクロマトグラフィー用ナットで閉じ、そしてこのカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けた。最初に、メタノールを異なる流量でそのカラムにポンプ輸送した。その管圧は、0.5mL/分の流量の時0.4MPaであり、流量が1mL/分の時0.8MPaであり、そして2mL/分の時1.6MPaであった。次に、この溶媒をテトラヒドロフランに置き換えた後の管圧は、0.2mL/分の時0.2MPaであり、そして2mL/分の時1.9MPaであった。この流量に対する管圧の依存性は線形であることが見いだされた。

これらの測定の後、このカラムの両端を開いて、溶媒管を用いてその多孔隙ポリマーロードを取り出した。

実施例11

該重合ストック溶液を0.15mL用いる以外は実施例1と同様な操作を用いた。この管から取り出した後のブラグカラムの長さは9mmであった。

このブラグカラムを50mLの丸底フラスコの中に入れた後、ジエチルアミンを5mL加えた。この内容物を3時間攪拌させた。その置き換えたメタアクリル酸グリジリル単位のエポキシ基がそのアミンと反応することでN、N-ジエチルアミノ-2-ヒドロキシプロピル基 (DEAHP) が生じ、これらの基は、イオン交換クロマトグラフィー使用蛋白質分離にとって必須である。この反応が終了した後、このロードをメタノール、水、及びメタノールで洗浄した後、乾燥させる。このDEAHP含有量は1.59ミリモル/gであることが確認された。

この乾燥させたブラグカラムをそのカラム管に戻し、水の中に2時間浸漬し、その末端を指で閉じた後、1つの末端をHPLCクロマトグラフのポンプに連結する一方、もう一方を検出器に連結しないままにしておいた。このような構造配置でその管圧を測定した。流量が1mL/分の時の管圧は0.5MPaであり、3mL/分の時のそれは1.3MPaであり、そして5mL/分の時のそれは2.2MPaであった。UV検出器に連結した後の管圧は、0.5mL/分の流量の時0.4MPaにまで上昇した。

このカラムを、そのベースラインのずれが生じなくなるまで(20分間)、0.02モル/Lのトリス-HCl緩衝液(pH=7.3)(緩衝液A)を0.5mL/分の流量で用い、クロマトグラフィー条件で洗浄した。0.21gのチクロロームC、リソチーム、ミオグロビンおよびオボアルブミンが入っている溶液を、ループを通過して注入した後、

上記ポリマーの選択液が吸収するまでにした。このカラムを通した上記疎液溶液のポンプ輸送を20分間行った後でも、染れる現象は全く見られなかった。その吸収は全体的であった。次に、勾配溶液を開始した。この溶媒組成は疎液Aから疎液B（疎液Aの中に1モル/Lの塩化ナトリウム）に、10分以内に直線的に変化させた。この平衡試験で用いたクロマトグラフィー条件は理想的な条件から選出したが、4種の蛋白質全ての分離が観察された。これらの蛋白質の保持時間は7、4、7、7、7、9および8、1分であった。

実施例11

実施例1で用いたのと同じ管の中に、3 mLのステレン、1、2 mLのジビニルベンゼン（85%のDVB）、5 mLのベンジルアルコールおよび0、05 gのベンゾイルパーオキサイドから成るスタック混合物を0、3 mL注入した。燃焼した後、この管を閉じ、そして重量を70℃で24時間進行させた。無灰ブランジャーを用い、長さ18 mmの多孔質ポリマーブロッグカラムをその管から押し出した後、メタノールをいくつかに分け、その中で4日間洗浄した。この洗浄後でもこのブロッグカラムは元の重量に達した。この溶媒をテトラヒドロフランに変えると、これはそのブロッグカラムの膨張を生じさせた。約20分後、このブロッグカラムの直径は、その管の直径以上になった。次の溶媒交換でメタノールを用いて、このブロッグカラムを元の大きさまで収縮させた。その後、このブロッグカラムをそのカラムに戻し、そして再びメタノールをテトラヒドロフランに交換した。このカラム内における膨張を管径の変化として監視し、この管径は、この管の厚みの部分がまだメタノールで浸されている時の0、3 MPaから始まって、この溶媒のいくらか

が交換された後の10 MPa以上にまで上昇した。その時点で、この装置に関する何らかの可能な損傷が生じるのを防止する目的で、この測定を終了した。

実施例12

重量を10分間バブリングすることによって、実施例1に記述したモノマー類の混合物を脱気した。マクロポリアルド [メタクリル酸グリシジル-エポキシメタクリル酸エチレン] ビードを高真空に浸漬した後、この水-ポリマー混合物を氷水ポンプ装置下で10分間凍結することによって、それらが育する孔から空気を除去した。次に、これらのビードの約1 mLを、連続的に空気をバブリングしている丸底ガラスビンの中に注ぎ込み、上記脱気した混合物を0、5 mLに加え、この混合物をガラス棒で撹拌した後、このビンを密封した。その重量を70℃で5時間進行させた。この重量が終了した後、このビンの内容物は均一であるように見えた。そのメタクリル酸グリシジルが育するエポキシ基とそのガラス表面が育するシラン基とが反応することから、このビンの膨張を生じさせることなくこのビンからそのブロックを取り出すのは不可能であった。そのようにして、そのブロックを数個からそのガラスを割断させるのは非常に大変であった。このブロックは、小さい片に割れる傾向を示さないか、或はその元のビードとそれに連続している共重合体とのフラグメントは分離する傾向を示さなかった。

実施例13

ステンレス鋼製カラム（内部直径が8 mmであり、長さ50 mm）の1つの末端を密封し、アルゴンでバブリングした後、そのもう一方の

末端をシリコンゴム隔膜で閉じた。35 mLのメタクリル酸グリシジル、24 mLのジメタクリル酸エチレン、72 mLのシクロヘキサノール、18 mLのデカノール、および0、5 gのアビスイソブチロニトリルを混合することによって、混合物を調製した。この混合物を氷水ポンプ装置下で15分間静置処理した後、更に15分間重量をバブリングすることによって、混合物の空気を除去した。このカラムの管を、上記重合混合物で完全に満たした後、この管を密封した。この重量を70℃の水浴内で8時間進行させた。この重量が完了した後、このカラムをその箱から取り出し、そして周囲温度にまで冷却させた。長さが50 mmであるそのロッドを洗浄する目的で、このカラムの両末端に在るスッターをクロマトグラフィー用指針に交換した後、このカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けられた。最初に、メタノールを異なる装置でそのカラムにポンプ輸送することでこのロッドの洗浄を行うと同時に、このカラムを通る流れを試験した。この管径は、0、5 mL/分の流量の時0、8 MPaであり、1 mL/分の時1、9 MPaであり、2 mL/分の時4 MPaであり、そして5 mL/分の時13 MPaであった。この管径は、この洗浄操作全体を通して変化しなかった。このカラムを通してポンプ輸送したメタノールの量は200 mLであった。

このカラムをそのクロマトグラフから取り外した後、このカラムの入り口に1 mLのジメチルアミンを注入した。このカラムの入り口と出口を、デルリン（delrin）ブロッグカラムで閉じた後、このカラムを、熱電対で80℃にした水浴の中に3時間入れた。次に、このカラムをHPLCクロマトグラフに取り付けした後、その炭化水素のアミンをメタノールで

洗浄除去した。この装置過程中、このブロッグカラムは膨張し、そしてこの膨張したポリマーが部分的にその孔を占める。これは、この洗浄過程を開始した時の管径が高いことで説明される。この管径は、流量が2 mL/分の時3 MPaであり、そして1 mL/分の時1 MPaであった。メタノールを用いて50分間洗浄した後、水-メタノールの1:1混合物を用いた。この管径は、0、5 mL/分の流量の時20 MPaにまで上昇した。更に1時間後、このメタノール-水混合物を蒸留水に交換した。この管径は、流量が0、5 mL/分の時6、6 MPa、そして1 mL/分の時12、7 MPaにまで低下した。最後に、このカラムを0、02 モル/Lのトリス-HCl緩衝液（pH=7、0）（疎液A）で洗浄した。流量が0、5 mL/分の時の管径は5、7 MPaであった。

ニワトリ卵アルブミン（8 mg/mL）、ニワトリ卵蛋白質（15 mg/mL）およびモデル蛋白質混合物（16 mg/mL）が入れられている溶液（2 L）を、ルーブを通して注入した後、疎液Aの入れの中で、その溶液マクロポリアルドブロッグカラムの間に10分間吸着させるまにさせた。疎液B（疎液Aの中に1モル/LのNaCl）の濃度勾配を用い、0、5 mL/分の流量で上記重合の溶離を行った。図1-3に示す数々のクロマトグラムは、それぞれアルブミン（図1）、卵蛋白質（図2）およびモデル蛋白質（図3）に関するものである。218 nmの波長でこれらの検出を行った。勾配クロマトグラフィーに通常の如く、用いた溶媒組成物の勾配から、図1-3のベースラインは平らでない。これらの図内の実験はクロマトグラムであり、そして溶媒組成の変化を示す目的で、点線を加えた。

実施例 V

直径が8 mmであり厚さが5.0 mmのステンレス鋼製管の1つの末端をシリコンゴム隔壁で閉じ、そしてもう1つの末端を固体状シリコンゴムプラグラムで閉じた。3 mLのステレン、2 mLのジビニルベンゼン、7.5 mLのドデカノールおよび0.5 gのアゾビスイソブチロニトリルを混合することによって、重合混合物を調製した。重量を15分間バージングすることによって、この混合物の脱気を行った。この混合物を、その重量を通してその複製管の中に注入した後、熱電対で70℃にした装置内でその管を加熱することにより、重合を開始させた。20時間後、この管をその熱炉から取り出し、そして周囲温度までゆっくりと冷却した。このカラムの両末端にあるスッターを取り外して、標準的なクロマトグラフィーカラム組みに取り替えた。このカラムをクロマトグラフに取り付けた後、メタノールを用い、0.1 mL/分の流量で1時間、そして1 mL/分の流量で30分間洗浄した。この2番目の洗浄操作後の背圧は一定して、0.2 MPaであった。

このカラムの出口を開け、そして20 mL/分の流量でメタノールを用い、このカラムからその混合したロッドを押し出した。このロッドを装置で乾燥し、粉砕して小さい片にした後、水相ポルシメトリ (porosilmetry) を用いて、このポリマーの孔サイズ分布を評価した。試験を2回繰り返した分布曲線を図4に示す。

実施例 VI

メタノールを用いた洗浄操作が完了した後、このカラムの出口端を手をUV検出器に接続する以外は、実施例 V の操作に従ってカラムを調製した。このカラムを、アセトニトリル-水 1:1 の混合物を用い、

請求の範囲

1. 分離用媒体が入っている管である高性能液体クロマトグラフィーに適切なカラムにおいて、上記管が実質管であり、そして該分離用媒体が、該実質管内に配置されておりそしてこの実質管の断面積全体を横切って伸びているマクロ孔有機ポリマーのワンピース連続プラグラムであり、ここで、上記プラグラムの厚さは少なくとも5 mmであり、そして上記プラグラムの、200 nm未満の直径を有する小さい孔と、600 nm以上の直径を有する大きな孔の両方を有しており、ここで、上記大きな孔が、このプラグラムの全細孔容積の少なくとも10%を有えており、そしてここで、上記プラグラムをボロン管容下の重合反応で製造することを特徴とするカラム。
2. 上記カラムがその管を通して有膜溶媒と水から選択される液体を少なくとも約200 cm³/時の線形速度および約3 MPa (4, 500 psi) 未満の圧力で通過させることを特徴とする請求の範囲1のカラム。
3. 該マクロ孔ポリマープラグラムが約30から90 μmの間隙を有していることを特徴とする請求の範囲1および2のカラム。
4. 該管がマクロ孔ポリマーの2個以上の異なるプラグラムを含んでいることを特徴とする請求の範囲1-3のカラム。
5. 該マクロ孔ポリマーがポリビニルモノマーのポリマーを含んでいることを特徴とする請求の範囲1-4のカラム。
6. 該マクロ孔ポリマーがポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの共重合体を含んでいることを特徴とする請求の範囲1-5のカラム。

1 mL/分の流量で2時間平衡にした。次に、この平衡を達成した数段階で2.5 mL/分の流量にまで上昇させ、そしてその背圧を記録した。その結果を図5に示すが、ここでは、その流量に対する背圧の線形依存性が明らかである。この結果は、クロマトグラフィーで用いるに妥当な背圧、即ち約40 MPa (6, 000 psi) 以下の範囲のままで、非常に高い流量でこの連続ロッドカラムが有効であることを立証している。ナトリウムC、ミオロゲンおよびニトリルアルブミンが入っている溶液をこのカラムに注入した後、勾配溶剤クロマトグラフィーを開始させた。水中20%のアセトニトリルから水中50%のアセトニトリルへの線形勾配を用いた。このアセトニトリル濃度をその開始濃度から最終濃度に変化させる時間 (勾配時間) は、5 mL/分の流量で4分、10 mL/分で2分、15 mL/分で1分、そして25 mL/分で0.8分であった。このクロマトグラムを図6に示す。

比較実施例 A

そのステンレス鋼製管を軟質ポリ (テトラフルオロエチレン) 管に置き換える以外は実施例1の操作を繰り返す。そのポリマープラグラムが備わっているその隔られる管を有するクロマトグラフに接続した場合、40 MPa (6, 000 psi) の約高い圧力でも、このプラグラムを通るテトラフルオロエチレンの流束は本質的に全く観察されなかった。実施例6と同様に、この管を切り取ってそのプラグラムを取り出すことによってこのプラグラムの孔サイズ分布を評価した後、約200 nm以上の孔は全く見いだされなかった。

7. (i) 両末端を閉じた実質管を、少なくとも10 μm厚のポリビニルモノマー、少なくとも40体積%のボロンおよび0.2から5重量%の開始剤を含んでいる脱気した重合混合物を加え、(ii) この混合物を該管内で重合させることによりマクロ細孔有機ポリマープラグラムを生じさせ、そして(iii) このポリマープラグラムを洗浄することによってそのボロンを除去する段階によって特徴づけられる、請求の範囲1-6のカラムを製造する方法。
8. 該重合混合物を少なくとも2つの部分として加え、これらの部分の各々に関して、次の部分を追加するに先立って重合を実施することと特徴とする請求の範囲7の方法。
9. 少なくとも2種の異なる重合混合物を連続的に加え、これらの混合物の各々に関して、次の混合物を追加するに先立って重合を実施することと特徴とする請求の範囲7の方法。
10. 該洗浄を、該プラグラムを該管の中に置きながら実施することと特徴とする請求の範囲7の方法。
11. 洗浄に先立って該管から該プラグラムを取り出した後、管に接することを特徴とする請求の範囲7の方法。
12. 該プラグラムを該管に閉じた後、このプラグラムを切断することと特徴とする請求の範囲11の方法。
13. 該重合混合物が更にモノビニルモノマーを含んでいることを特徴とする請求の範囲7の方法。
14. 該ボロンが該媒体または可溶ポリマー-媒から成る群から選択されることを特徴とする請求の範囲7および13の方法。
15. 該重合混合物が、重合中の体積損失を低くするための不溶

【公報種別】特許法第17条第1項及び特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第6部門第1区分

【発行日】平成12年3月14日(2000.3.14)

【公表番号】特表平7-501140

【公表日】平成7年2月2日(1995.2.2)

【年通号数】

【出願番号】特願平5-507935

【国際特許分類第7版】

G01N 30/48

B01D 15/08

G01N 30/48

【F I】

G01N 30/48 G

B01D 15/08

G01N 30/48 M

手続料金 12,000円

平成11年9月30日

特許庁長官 近藤 隆 啓 殿

1. 事件の系属

平成5年特許第507935号

2. 補正をする者

事務との関係 特許出願人

名称 コーネル・リサーチ・フアウンデーション・インコーポレーテッド

3. 代理人

〒107-0052

住所 東京都港区赤坂1丁目9番15号

日本自由貿易会 東京

氏名(印) 伊藤 上 小田 幸 吉

電話 3555-2256

4. 補正の目的

なし

5. 補正の理由

1994年1月13日付理由の補正(平成6年4月15日付理由の補正を差し出す)の明細書の「特許請求の範囲」の欄及び「発明の詳細な説明」の欄

6. 補正の内容

1) 特許請求の範囲を前記の如く訂正する。

2) 明細書第25頁、最下段「全く異い」を「異な」の次に改文を挿入する。

「本発明の実施の形態を示す次のとおりである。

1. 分離用部品が入っている管である多孔性膜状クロマトグラフィに適用なカラムにおいて、上記管が管壁であり、そして該管壁を構成する多孔性膜状クロマトグラフィの管壁は、該管壁内に設けられており、そしてこの管壁の前面領域全体を構成して伸びているマクロ細孔有膜ポリマーのワンピース連続プラグカラムであり、ここで、上記プラグカラムの厚さは少なくとも5mmであり、そして上記プラグカラムは、200nm未満の孔径を有する小さい孔と、600nm以上の孔径を有する大きな孔の両方を有しており、ここで、上記大きな孔が、このプラグカラムの全細孔容積の少なくとも10%を与えており、そしてここで、上記プラグカラムをポロゲン存在下の重合反応で製造することを特徴とするカラム。

2. 上記カラムがそこを流して有機溶媒と溶かす選択される液体を少なくとも約200cm/時の流速流し上げ約30MPa(4.500psi)未満の圧力で循環させることを特徴とする上記1のカラム。

3. 該マクロ細孔ポリマープラグカラムが約30から90%の空隙率を有していることを特徴とする上記1および2のカラム。

4. 該管がマクロ細孔ポリマーの2種以上の異なるプラグカラムを含んでいることを特徴とする上記1-3のカラム。

5. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルピロリドン(PVDM)のポリマーであることを特徴とする上記1-4のカラム。

6. 該マクロ細孔ポリマーがポリビニルモノマーとモノビニルモノマーとの重合体を含んでいることを特徴とする上記1-5の方法。

7. (1) 両末端を開いた架橋樹脂に、少なくとも10種類以上のポリビニルモノマー、少なくとも40種類以上のポロゲンおよび、2から5重量%の親脂質を含んでいる親脂質の重合体を加え、(11) この重合体を装置内で重合させることによりマクロ細孔有機ポリマーブラスラムを生じさせ、そして(111) このポリマーブラスラムを洗浄することによってポロゲンを除去する段階によって特徴づけられる、上記1-6の方法。

8. 該重合体成分物を少なくとも2つの部分として加え、これらの部分の各々に関して、次の部分を添加するに先立って重合を遂行することを特徴とする上記7の方法。

9. 少なくとも2種の異なる重合体成分物を連続的に加え、これらの重合体の各々に関して、次の重合体を添加するに先立って重合を遂行することを特徴とする上記7の方法。

10. 該成分を、該ブラスラムを装置の中に浸漬しながら添加することを特徴とする上記7の方法。

11. 洗浄に先立って装置から該ブラスラムを取り出した後、管に戻すことを特徴とする上記7の方法。

12. 該ブラスラムを装置に戻した後、このブラスラムを乾燥させることを特徴とする上記11の方法。

13. 該重合体成分物がモノビニルモノマーを含んでいることを特徴とする上記7の方法。

14. 該ポロゲンが炭素または可溶性ポリマー類から成る層から選択

されることを特徴とする上記7および13の方法。

15. 該重合体成分物が、重合中の体積縮小を低くするためのポリマー粒子を含んでいることを特徴とする上記7の方法。

16. 該ポリマー粒子を、重合体成分物と組み合わせるに先立って、この重合体成分物に親脂質を示さない媒体に浸漬することを特徴とする上記7-15の方法。

17. 該可溶性ポリマー粒子がマクロ細孔性を示し、そしてこれらを、該重合体成分物と同じモノマーから生じさせることを特徴とする上記15の方法。

18. 上記1から6の方法を用いることを含む、該クロマトグラフィーによる化合物の分離方法。』

(別紙)

請求の範囲

1. 分離用媒体が入っている管である高性能液体クロマトグラフィに適切なカラムにおいて、上記管が親脂質であり、そして該分離用媒体が、該親脂質内に配設されておりそしてこの親脂質の断面積が全長を横切って伸びているマクロ細孔有機ポリマーのワンデースペースゲルブラスラムであり、ここで、上記ブラスラムの厚さは少なくとも5mmであり、そして上記ブラスラムは、200nm未満の厚さを有する小さい孔と、0.01mm以上の厚さを有する大きな孔の両方を有しており、ここで、上記大きな孔が、このブラスラムの全断面積の少なくとも10%を与えており、そしてここで、上記ブラスラムをポロゲン存在下の塩み状態で製造することを特徴とするカラム。

2. (1) 両末端を開いた架橋樹脂に、少なくとも10種類以上のポリビニルモノマー、少なくとも40種類以上のポロゲンおよび、2から5重量%の親脂質を含んでいる親脂質の重合体を加え、(11) この重合体を装置内で重合させることによりマクロ細孔有機ポリマーブラスラムを生じさせ、そして(111) このポリマーブラスラムを洗浄することによってポロゲンを除去する段階によって特徴づけられる、請求の範囲1記載の方法。